Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización con antioxidantes.

Por M. T. B. Pacheco y D. Barrera-Arellano

Laboratorio de Oleos e Gorduras. FEA/UNICAMP
Caixa Postal 6091. Campinas - S.P. 13081-970 - Brasil

RESUMEN

Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización con antioxidante.

Hígados triturados de tiburón azul (*Prionace glauca*) fueron sometidos a cocimiento (75°C x 15 min) para obtención del aceite crudo. El aceite fue caracterizado y fraccionado por cristalización en seco. La concentración de ácidos grasos poliinsaturados fue del 28% en el aceite crudo, 24% en la estearina y 33% en la oleína. En el aceite y sus fracciones se determinó la estabilidad oxidativa por el método Rancimat (80°C, 2,5g muestra y 20L/h aire). La eficiencia del BHT, TBHQ, Ascorbil palmitato puros y los antioxidantes comerciales formulados Antracina 220, Tocomix D y Renoxan A fue determinada a diversas concentraciones. El antioxidante TBHQ fue el más eficiente entre los sintéticos. Renoxan A (antioxidante natural) mostró alta eficiencia, pero menor que el TBHQ.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de hígado de tiburón - Antioxidante - Estabilidad oxidativa - Fraccionamiento.

SUMMARY

Blue shark liver oil (*Prionace glauca*): Fractionation and stabilization with antioxidants.

Crude oil was obtained by boiling (75°C / 15 min) mashed livers of the blue shark (*Prionace glauca*). The crude oil was dry fractionated and the oxidative stability of both the crude oil and its fractions (olein and stearin) was evaluated using the Rancimat method (80°C; 2.5 g sample; 20L/h air flow). The efficiency of the following antioxidants, Butylated Hydroxy Toluene (BHT), Tertiary Butyl Hydroquinone (TBHQ), Ascorbil Palmitate (PA), ANTRACINE 220 (TBHQ + citric acid), TOCOMIX D (α and γ tocopherols) and RENOXAN A (Ascorbil Palmitate + Lecitin + α tocopherol), were tested in various concentrations. The concentration of polyunsaturated fatty acids was 28% in the whole crude oil; 24% in the stearin fraction and 33% in the olein; the oxidative stability was inversely related to the content of polyunsaturated fatty acids. TBHQ was the most efficient antioxidant in crude oil as well as in the fractions. Treatment with the natural antioxidant RENOXAN A was also highly efficient, though less so than TBHQ.

KEY-WORDS: Antioxidant - Fractionation - Oxidative stability - Shark liver oil.

1. INTRODUCCION

La captura del tiburón, por los barcos atuneros con sede en Santos (São Paulo) y en otros estados de Brasil, ha merecido atención en los últimos años, por el volumen que representa; siendo al tiburón azul (*Prionace glauca*) al que corresponde el mayor porcentaje entre las especies capturadas. Basándose en este potencial, existe un interés creciente en el aprovechamiento integral de este recurso,

con la finalidad de valorizar su explotación (Amorin et al, 1987). Los tiburones, por ser peces cartilaginosos, poseen un hígado relativamente grande en relación al peso total, puesto que desempeña una función hidroestática, semejante a la vejiga natatoria en los peces teleosteos. La densidad promedio del hígado está relacionada con la cantidad de lípidos almacenados, dado que el alto contenido de aceite permite que estos animales floten con mayor facilidad. El tamaño y el peso del hígado varían en función de la especie, edad y estación del año, alcanzando en algunas especies un quinto del peso total, acumulando en algunos casos hasta un 90% de aceite (Van Vleet, 1984).

Tradicionalmente, los aceites de hígado de pescado son utilizados como aceites medicinales, principalmente en la preparación de concentrados vitamínicos, debido a las cantidades apreciables de vitaminas A y D. Recientemente, el interés por los lípidos de origen marino, ha aumentado considerablemente, en función de los ácidos grasos omega-3 ($\omega-3$). Ese interés resultó de los estudios epidemiológicos realizados durante más de 20 años con esquimales de Groenlandia, donde se constató que la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados $\omega-3$ reduce los riesgos de enfermedades arterioescleróticas, disminuyendo los niveles de triacilglicéridos y colesterol en la sangre (Hajaltason, 1992).

En estudios anteriores, se verificó que el aceite de hígado de tiburón, como los aceites marinos, en general, contienen una gran variedad de ácidos grasos de cadena larga, altamente insaturados, que los tornan muy susceptibles a la oxidación (Pacheco et al., 1991; Breivik, 1992). La ingestión de aceites marinos no estabilizados puede exponer al individuo a productos tóxicos, una vez que la auto-oxidación lipídica lleva a la formación de compuestos indeseables, que pueden tener un papel importante en la carcinogénesis, en la inhibición de la producción de prostaciclina, además de otros efectos adversos (Shukla y Perkins, 1991). Por lo tanto, para cualquier enfoque que tomen las aplicaciones tecnológicas del aceite de hígado de tiburón, se hace necesario una evaluación preliminar de su resistencia a la oxidación y de los agentes que podrían emplearse en su estabilización. En este estudio, através del proceso de fraccionamiento en seco, se obtienen dos fracciones con diferente contenido de ácidos grasos poliinsaturados, evaluándose su estabilidad oxidativa, así como el efecto de varios antioxidantes.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Muestras

Se utilizaron hígados congelados de tiburones de la especie *Prionace glauca*, capturados en alta mar, en la costa sureste del Brasil, entre los meses de junio/julio de 1991, colectados y clasificados por el Instituto de Pesca (Santos-SP).

2.2. Determinaciones analíticas

En la caracterización del aceite crudo y sus fracciones, se utilizaron los métodos indicados en la Tabla I.

2.3. Procedimiento experimental

El aceite crudo se obtuvo a partir de las muestras del hígado desintegrado mecánicamente, y luego sometidas a cocción a 75°C durante 30 minutos, recogiendo el aceite sobrenadante. Posteriormente, el aceite fue centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos, secado con sulfato de sodio anhidro y filtrado al vacío, obteniéndose así un aceite translúcido y seco. A continuación el aceite crudo fue fraccionado por cristalización en seco, según el programa de temperatura y tiempo expuesto en la Figura 1.

En el estudio de la estabilidad oxidativa, la concentración de los antioxidantes empleados no superó el límite máximo permitido para aceites comestibles en Brasil (15), y cuyos valores están especificadas en la Tabla II.

Figura 1
Programa de temperatura y tiempo para el fraccionamiento del aceite crudo de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*)

Tabla I

Métodos utilizados en la determinación de la composición y características del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y sus fracciones.

Muestra *	Análisis	Método
1,2,3	Acidez	Ca 5a-40, (AOCS, 1987)
1,2,3	Índice yodo	Ca 1b-87, (AOCS, 1987)
1,2,3	Índice peróxido	Cd 8-53, (AOCS, 1987)
1,2,3	Índice saponificación	Cd 3-25, (AOCS, 1987)
1,2,3	Índice refracción	Cc 7-25, (AOCS, 1987)
1,2,3	Mat. Insaponificable	Ca 6b-53, (AOCS, 1987)
1	Hidrocarburos	Marquesan, 1988
1	Fósforo	Hartman <i>et al.</i> , 1985
1,2,3	Composición Ácidos grasos	Ce 1-62, (AOCS, 1987)
1	Tocoferoles	Contreras y Strong, 1982
1	Esteroides	2.403, (IUPAC, 1987)
1,2,3	Triglicéridos totales	Tartara <i>et al.</i> , 1983
1,2,3	Vitamina A	Leenher <i>et al.</i> , 1985
1,2,3	Estabilidad oxidativa	Laubli y Bruttel, 1986

*1 = Aceite crudo

2 = Oleína

3 = Estearina

Tabla II

Composición y concentración de los antioxidantes evaluados en la estabilización del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y sus fracciones.

Antioxidantes	Concentración (g/100g aceite)	Principales compuestos químicos de la formulación
TBHQ	0.02/0.01/0.005	Ter-butil hidroquinona
BHT	0.01	Butil-hidroxitolueno
PA	0.05	Palmitato de ascorbilo
TOCOMIX D	0.05	α - y γ -tocoferol + citrato monoglicerido
RENOXAN A	0.20/0.12/0.04	PA + lecitina + γ -tocoferol

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El alto contenido de aceite (80% b.s.) existente en el hígado de tiburón azul, permite la utilización de técnicas y equipos simples, en consecuencia, los costos operacionales son menores que para los aceites vegetales.

La opción por el método de fraccionamiento por cristalización en seco del aceite crudo, en relación a otros procesos, fué debido a que se trata de una técnica relativamente simple, sin uso de reactivos o solventes químicos, que no requiere mano de obra especializada, reduciendo también los costos operacionales. El aceite crudo sometido al proceso de fraccionamiento por cristalización en seco, por un período de 24 horas (Figura 1), rindió 32% de una fracción sólida (estearina) y 68% de una fracción líquida (oleína). En dicho proceso se da una concentración de ácidos grasos poliinsaturados en la oleína (aproximadamente 5%) en relación a la estearina. Esta concentración también reduce la estabilidad de la oleína en aproximadamente un tercio, con respecto al aceite crudo.

Los datos obtenidos en las determinaciones referentes a la caracterización y composición del aceite crudo y sus fracciones se encuentran en la Tabla III. Los valores de los índices de refracción, yodo y saponificación verifican la presencia de altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. El contenido de material insaponificable es inferior a los citados en la literatura para la misma especie (Gordievskaya, 1971; Salvo et al., 1976), dado que valores de esa magnitud son característicos de tiburones que habitan en aguas superficiales. Los esteroides corresponden al 31,12% de la fracción insaponificable, donde predomina el colesterol, constituyendo el 87,2% de este total. Los índices de yodo y refracción aumentan en el orden estearina, aceite crudo y oleína, en función del contenido, también creciente, de ácidos grasos poliinsaturados. En el proceso de fraccionamiento, algunos componentes menores se concentran en una de las fracciones y de esta manera, la estabilidad oxidativa se ve afectada (Young, 1987). Se observó una concentración de vitamina A en la oleína, probablemente esterificada con un ácido graso de cadena larga, abundante en esta fracción.

Tabla III

Algunas características y composición del aceite crudo de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y sus fracciones.

Característica/Compuestos	Aceite crudo	Estearina	Oleína
Acidez (% ac. oleico)	0,15	0,13	0,16
Índice de peróxido (meq/Kg)	0,95	1,62	1,79
Índice de saponificación	148,21		
Índice de yodo	151,71	135,47	171,03
Índice de refracción (40°C)	1,4778	1,4744	1,7778
Triglicéridos totales (%)	93,93	96,52	93,63
Ac. grasos saturados (%)	30,01	38,10	24,72
Ac. grasos monoinsaturados (%)	41,23	37,40	41,48
Ac. grasos poliinsaturados (%)	28,15	23,97	32,84
Vitamina A (UI/g)	1630,00	900,00	1940,00
Fósforo (ppm)	3,6		
Materia insaponificable (%)	5,43		
Hidrocarburos (%)	0,35		
Esteroides (%)	1,69		
Vitamina E (mg/g)	0,45		

En la Tabla IV se muestra la composición de ácidos grasos del aceite crudo y sus fracciones. El mayor efecto del fraccionamiento fué encontrado en los cambios en la composición de ácidos grasos saturados. La porción de ácidos saturados aumenta en la estearina, en cuanto los poliinsaturados aumentan en la oleína. No fueron observados cambios significativos con respecto a los monoin-saturados entre el aceite crudo y la oleína. Los ácidos grasos encontrados en mayor proporción fueron palmítico (C16:0), oleico (C18:1) y docosahexaenoico (C22:6), además de cantidades apreciables de ácidos grasos característicos de aceites marinos como C20:4, C20:5 y C22:5. El proceso de fraccionamiento ocasiona una concentración, de ácidos grasos insaturados omega-3 en la oleína del 32,84%, superior en 4,69% y 8,87% al presente en el aceite crudo y estearina respectivamente. En la fracción estearina se observa una concentración significativa de ácido palmítico y de otros ácidos grasos saturados, así como una reducción de ácidos grasos poliinsaturados.

La estabilidad oxidativa, medida por el período de inducción (PI) del aceite y sus fracciones sin aditivos, fué de 12,0, 12,6 y 8,0 h para aceite crudo, estearina y oleína respectivamente. El PI menor en la oleína se debe a su contenido mayor de ácidos grasos poliinsaturados y por tener un índice de peróxidos mayor que el aceite crudo resultante de la concentración de solutos durante el fraccionamiento. El comportamiento oxidativo de las fracciones del aceite de hígado de tiburón fué inverso al del aceite de palma (Young, 1987). En el aceite de palma, aunque la oleína presenta un contenido mayor de ácidos grasos insaturados, su resistencia a la oxidación es mayor que la estearina, por contener tocoferoles y carotenos (antioxidantes naturales). En el aceite de hígado de tiburón además del alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, el aporte de los tocoferoles a la estabilidad puede ser considerado insignificante, ya sea por su bajo contenido o por la forma predominante, α -tocoferol, que a pesar de tener alta actividad biológica, posee la menor actividad antioxidante (Gottstein y Grosch, 1992).

Tabla IV
Composición de ácidos grasos del aceite crudo de hígado de tiburón (*Prionace glauca*) y sus fracciones.

Acido graso (%)	Aceite crudo	Estearina	Oleína
C14:0	4,19	4,99	3,96
C14:1	0,46	0,58	0,44
C15:0	0,76	1,21	0,68
C16:0	19,80	26,47	16,33
C16:1	7,72	6,31	7,20
C:17:0	1,46	0,43	0,49
C18:0	3,80	5,00	3,26
C18:1	24,84	22,45	26,20
C18:2	0,62	0,55	0,67
C20:1	7,79	7,58	8,00
C20:4	2,87	4,98	6,18
C20:5	4,59	3,87	4,75
C22:5	1,74	1,48	1,97
C22:6	18,95	13,64	19,94

Los resultados del empleo de antioxidantes (naturales y sintéticos), obtenidos a partir de las curvas de resistencia a la oxidación, pueden ser observados en las Figuras 2 y 3. Las muestras adicionadas de TOCOMIX D, presentan un PI ligeramente superior al control, revelando poca eficiencia, tanto en el aceite crudo, como en las fracciones. En la estearina, con mayor contenido de saturados, mostró la mayor protección. El Ascorbil Palmitato presentó una capacidad antioxidante media en el aceite crudo y estearina y

ningún efecto en la oleína. Este antioxidante es más activo en aceites vegetales que contienen tocoferoles, aunque en grasas animales se ha mostrado ineficaz (Borgeois, 1981). La evaluación del RENOXAN A, en varias concentraciones, indica que existe un efecto sinergista entre los componentes de esta formulación. El RENOXAN A aplicado en concentración de 0,02% mostró la mayor actividad antioxidante en todas las muestras, cuando se comparó con los otros antioxidantes naturales.

Figura 2

Eficiencia de antioxidantes naturales en la estabilización del aceite crudo de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y sus fracciones. Rancimat 80°C, 5 g de muestra y 20L/h de flujo de aire.

Abreviaturas:

TOC = Tocomix D; PA = Palmito de ascorbilo y REN = Renoxan A

Figura 3

Eficiencia de antioxidantes sintéticos en la estabilización del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y sus fracciones. Rancimat 80°C, 5 g de muestra y 20L/h de flujo de aire.

Abreviaturas:

ANT = Antracine 220; TBHQ = ter-Butil-hidroquinona y BHT = Butil-hidroxitolueno.

Entre los antioxidantes sintéticos (Figura 3), el BHT presentó menor actividad, tanto en el aceite crudo como en las fracciones, siendo ligeramente más eficaz sobre la estearina. EL BHT proporciona, relativamente, una baja eficiencia en aceites mas insaturados, siendo en este caso más activo, si está combinado con otros antioxidantes primarios (Sherwin, 1976). El ANTRACINE 220 (0.05%) duplicó el período de inducción del aceite crudo (25,2h) y de la estearina (30,9h), en relación al control. Entre tanto, el antioxidante TBHQ (sintético) fué el más eficiente, en la estabilización del aceite crudo y sus fracciones, aumentando en aproximadamente tres veces el PI, cuando se utilizó en la concentración de 0.02%. Este fenómeno fué observado por Kaitaranta (1992) en aceite de "Capelin" (*Mallotus villosus*) en Noruega. Esa capacidad antioxidante puede ser atribuida al hecho de que el TBHQ, presenta dos grupos hidroxilos en la posición *para*, permitiéndole al compuesto reaccionar rápidamente con radicales libres. En estudios sobre el mecanismo de acción del antioxidante TBHQ y sus cambios químicos durante el proceso, se aislaron dos compuestos, donde uno de ellos (el benzofurano), también presenta una notable actividad antioxidante (Kurekhi et al., 1985), prolongando la actividad antioxidante del TBHQ.

Sin embargo, se verificó, por comparación de los períodos de inducción, que la eficiencia del RENOXAN A en la concentración de 0,20% es relativamente semejante a la del antioxidante TBHQ, en la concentración intermedia 0,01%. El hecho de que el RENOXAN A sea clasificado como un antioxidante natural, le da ciertas ventajas para su aplicación en productos finales, por ejemplo, en aceites encapsulados. En el caso de aceites crudos que necesitan pasar por muchas etapas de procesamiento, seria recomendable usar TBHQ, que mostro ser un antioxidante mas eficiente para este tipo de productos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) por la beca concedida a M. T. B Pacheco y al GTZ (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit) por el apoyo financiero.

BIBLIOGRAFIA

- Amorim, A., Arfelli, C. A. y Braga, F. M. S. (1987).- "Resumos da III Reunião do Grupo de Trabalho sobre Pesca e Pesquisa de Tubarões e Raias no Brasil".- Instituto de Pesca, Santos.
- Van Vleet, E. S. (1984).- "Neutral lipids components of eleven species of Caribbean sharks".- Comp. Biochem. Physiol. **79b**, 549-554.
- Hajaltason, B. (1992).- "Fish oils as vitamin sources".- AOCS Short Course. Modern Application of Marine Oils. AOCS . Toronto.
- Pacheco, M. T. B., Esteves, W. y Barrera-Arellano, D. (1991).- "Características do fígado de cação azul (*Prionace glauca*) e de cação anequim (*Isurus oxyrinchus*) e avaliação química das suas frações lipídicas".- Cienc. Tecnol. Aliment. **11**, 274-283
- Breivik, H. (1992).- "N-3 Concentrates: A Scandinavian view-point".- AOCS Short Course. Modern Application of Marine Oils. AOCS. Toronto.
- Shukla, V. y Perkins, E. G. (1991).- "The presence of oxidative polymeric material in encapsulated fish oils".- Lipids **26**, 23-26.
- A.O.C.S. (1987).- "Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society".- 3 ed. Washington.
- Marquesan, M. A. (1988).- "Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja".- Tese de mestrado FEA, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Hartman, L., Lago, R. C. y Esteves, W. (1985).- "Determination of phosphorus in Brazilian soya bean oils by the saponification method".- Fette Seif. Anstrichm. **87**, 458-460.
- Conterras, E. y Strong III, F. G. (1982).- "Determination of tocopherol (vitamin E) by reduction of cupric ion".- J. Ass. Anal.Chem. **65**, 1215-1221.
- I.U.P.A.C. (1987).- "Standard Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists".- 7th Ed. Blackwell Scientific Publications. Boston. p. 165.
- Tartara, T., Fugi, T., Kawase, T. y Minagawa, M. (1984).- "Quantitative determination of tri-di, monooleins and free oleic acid by the thin chromatography flame ionization detector system using internal standards and boric acid impregnated chomarod".- Lipids **18**, 732-736.
- Laubli, M. W. y Bruttel, P. A. (1985).- "Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the Active Oxygen Method (AOCS cd 12-57) and the Rancimat method".- J. Am. Chem. Soc. **63**, 792-795.
- A.B.I.A. (1988).- "Compendio da Legislação de Alimentos".- 3º Rev., p.27. São Paulo, Brasil.
- Leenheer, A. P., Hans, J., Lambert, W. E. y DeRuiter, G. M. (1985).- "Vitamin A: retinol, carotenoids and related compounds" en "Modern Chromatographic-Análisis of Vitamins". Vol.30 p. 1 - Leenheer, A. P., Lambert, W. E., DeRuiter, G. M. (Ed).- Marcel Dekker, New York.
- Gordievskaya, V. S. (1971).- "Shark Flesh in the Food Industry".- Pacific Scientific Institute of Marine Fisheries and Oceanography.- TINRO, Vladivostok.
- Salvo, F., Toscano, M., Duco, G. y Alfa, M. (1976).- "Composizione in acid grassi dell'olio di fegato di selacei".- Riv. Ital. Sost. Gras. **64**, 157-160.
- Young, F. V. K. (1 987).- "Refining and Fractionation of palm oil". en "Palm Oil" Vol. 15, p.39-F.D. Gunstone (Ed.).- John Wiley & Sons, Chichester.
- Gottstein, T. y Grosch, W. (1992).- "Model study of different antioxidants properties of tocopherols in fats".- Fat Sci. Technol. **92**, 139-144.
- Borgeois, C. F. (1981).- "Propriétés antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses".- Rev. Fr. Corps Gras. **28**, 353-356.
- Sherwin, E. R. (1976).- "Antioxidants for vegetable oils".- J. Am. Oil Chem. Soc. **53**, 430-436.
- Kaitaranta, J. K. (1992).- "Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds".- J. Am. Oil Chem. Soc. **69**, 810-813.
- Kurekhi, T., Aizawa, M. y Kunugi, S. (1985).- "Study on the antioxidants XV-II oxidation product of tertiary butyl hidroquinone (TBHQ)".- J. Am. Oil Chem. Soc. **60**, 1878-1882.

(Recibido: Octubre 1993)